

毛果杨 *ZHD* 家族全基因组水平鉴定及 在干旱胁迫下的表达分析

陈雪冰¹, 刘 聪¹, 程 赫¹, 姜廷波¹, 夏德安¹, 魏志刚²

(1. 东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 中国林业科学研究院 国家林业和草原局盐碱地研究中心, 北京 100091)

摘要: 【目的】对毛果杨 *Populus trichocarpa* *ZHD* (*PtrZHD*) 家族进行生物信息学以及干旱胁迫下表达特性分析, 为研究 *PtrZHD* 在干旱胁迫中的功能提供参考。【方法】利用生物信息学方法从全基因组水平鉴定出毛果杨 *ZHD* 家族全部成员, 并对其进化、理化性质、基因结构、保守基序、启动子顺式作用元件和表达特性进行分析。【结果】毛果杨 *ZHD* 家族包括 21 个成员, 可分为 7 个亚家族; 有 8 对同源基因, 且非同义替换率 (K_a)/同义替换率 (K_s) 值远小于 1。该家族成员理化性质存在差异, 但其结构较为保守, 均含有 Motif 1; 启动子区含有数量不等的激素和非生物胁迫响应元件, 不同基因之间响应元件的种类存在差异。在毛果杨 *PtrZHDs* 中, 分别有 1、7 和 13 个基因在根、茎和叶组织中具有偏好性表达特征; *PtrZHD* 家族成员对干旱胁迫的响应具有组织和时间表达特异性, 在根、茎和叶部组织中各成员的表达量不同, 但随着干旱胁迫时间的增加均呈先上升后下降的趋势。【结论】*PtrZHD* 家族基因对干旱胁迫有不同程度的响应, 可调控毛果杨对干旱胁迫的应答。图 6 表 2 参 27

关键词: 毛果杨; *ZHD* 家族基因; 生物信息学分析; 组织表达; 干旱胁迫

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2022)03-0465-10

Genome-wide identification of *ZHD* gene family of *Populus trichocarpa* and its expression under drought stress

CHEN Xuebing¹, LIU Cong¹, CHENG He¹, JIANG Tingbo¹, XIA De'an¹, WEI Zhigang²

(1. State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150000, Heilongjiang, China; 2. Research Center of Saline and Alkali Land of National Forestry and Grassland Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] With an investigation of the bioinformatics information of the *ZHD* gene family of *Populus trichocarpa* (*PtrZHD*) and an analysis of the expression characteristics of this gene family under drought stress, This study is aimed to provide reference for exploring the functions of *PtrZHD* in drought stress. [Method] Bioinformatics was used to identify all members of the *ZHD* gene family in *P. trichocarpa* at the genome-wide level before an analysis was conducted of their evolution, physicochemical properties, gene structure, conserved Motifs, cis-acting elements of the promoter and expression characteristics. [Result] The *ZHD* gene family of *P. trichocarpa* consisted of 21 members, which could be divided into 7 subfamilies. There were 8 pairs of homologous genes in the *ZHD* gene family of *P. trichocarpa*, and the K_a/K_s value of each pair of homologous genes was far lower than 1. Though with different physicochemical properties, *PtrZHD* gene family members had relatively conservative structures, all containing Motif 1. Different numbers of hormone

收稿日期: 2021-05-14; 修回日期: 2021-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31770640); 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (CAFYBB2020ZA005)

作者简介: 陈雪冰 (ORCID: 0000-0002-3845-8979), 从事林木遗传育种研究。E-mail: 1105010414@qq.com。通信作者: 魏志刚 (ORCID: 0000-0002-0777-9817), 教授, 博士, 博士生导师, 从事林木基因组学研究。E-mail: zhigangwei1973@163.com

and abiotic stress response elements were found in the promoter regions of *PtrZHD* gene family members with various response elements among different genes. One, seven and thirteen members of the *PtrZHDs* gene family were preferentially expressed in the root, stem and leaf tissues of *P. trichocarpa*, respectively. The response of *PtrZHD* gene family members to drought stress was tissue-specific and time-specific with the expression levels of each member of *ZHD* gene family being different in root, stem and leaf tissues, yet with the increase of drought stress time, they all showed a trend of first increasing and then decreasing. [Conclusion] Different members of the *PtrZHD* gene family had different responses to drought stress, indicating that they might regulate the response of *P. trichocarpa* to drought stress. [Ch, 6 fig. 2 tab. 27 ref.]

Key words: *Populus trichocarpa*; *ZHD* gene family; bioinformatics analysis; tissue expression; drought stress

植物在生长发育过程中会通过不断调整基因的表达来适应各种逆境,而转录因子(TFs)是其调控过程的关键因子^[1]。研究表明:锌指同源结构域(ZF-HD)转录因子作为一种同源异形盒(HB)蛋白在调控植物生长发育以及响应多种生物和非生物胁迫方面发挥着重要作用^[2-3]。ZF-HD不仅具有同源结构域(HD),还包括1个高度保守的锌指结构域(ZF)^[4],ZF是由2对保守的半胱氨酸(Cys)和/或组氨酸(His)残基结合单个锌离子组成的指环状结构蛋白,可特异性与DNA/RNA序列结合,并参与蛋白质互作^[2,5];HD是1个约60个氨基酸的DNA结合域(DBD),这段序列折叠成一个识别螺旋附着在DNA的大沟上,特异性地结合DNA来激活或抑制靶基因的表达^[6]。为了方便研究该家族的进化史,HU等^[7]将ZF-HD重新命名为ZHD。

ZHD蛋白可分ZHD和小锌指(MIF)两类,两者都含有ZF结构域,但MIF缺少HD结构域^[8]。2001年ZHD首次在黄花菊 *Flaveria trinervia* 中被鉴定出来^[9],随后拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[10]、水稻 *Oryza sativa*^[11]、葡萄 *Vitis vinifera*^[8]、大白菜 *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*^[2]、番茄 *Solanum lycopersicum*^[3]、茶树 *Camellia sinensis*^[5] 和黄瓜 *Cucumis sativus*^[12] 等的ZHD被陆续发现。研究表明:ZHD能够调控植物的抗逆性,如过表达 *AtZHD1* 可以提高拟南芥的耐旱性^[13]; *OsZHD1* 基因过表达导致水稻叶片卷曲下垂,降低水稻的耐旱性^[14];在大豆 *Glycine max* 中,过表达 *GmZF-HD1* 和 *GmZF-HD2* 会与编码钙调蛋白的 *GmGm4* 基因启动子结合增强大豆的抗病能力^[15]; *TaZFHD1* 参与小麦 *Triticum aestivum* 生长发育过程中茉莉酸(JA)、脱落酸(ABA)和乙烯(ET)信号转导过程,调节小麦对胁迫的抗性^[16];大白菜中的 *BraZF-HD* 受光、低温等非生物胁迫诱导表达^[2];此外,水稻 *ZHDs* 与 *OsDREB1B* 基因的启动子结合调节水稻对低温、干旱和机械损伤的抗性^[17]。ZHD广泛存在于植物中,在植物对环境胁迫响应过程中起着重要的作用。

毛果杨 *Populus trichocarpa* 是研究木本植物生长发育、材质材性以及抗逆性状的重要模式植物,但是目前毛果杨 *ZHD* (*PtrZHD*) 家族及非生物胁迫响应特性的研究尚无报道。本研究通过生物信息学手段鉴定了毛果杨全基因组内的 *PtrZHDs* 基因,并对其编码蛋白特征、系统发育、基因扩张、基因结构与保守基序、启动子顺式作用元件和表达特性进行分析,为研究该家族基因的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

将来自中国科学院分子植物科学卓越创新中心的野生型毛果杨‘Nisqually-1’通过组织培养扩繁后,选取长势一致的4周龄组培苗随机分成6组,用质量分数为8%的聚乙二醇(PEG 6000,来自邢台鑫蓝星科技有限公司)水溶液处理0、3、12、24、48和72 h,分别采集各处理组植株的根、茎和叶部组织,经液氮速冻后保存于-80℃冰箱,每组处理重复3次。

1.2 *PtrZHD* 家族成员鉴定及理化性质分析

利用拟南芥 *ZHD* 家族成员的氨基酸序列比对 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 网站中毛果杨基因组数据库获得候选序列,将得到的序列上传到 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 数据库,去除不含 ZF-HD_dimer (PF04770) 结构域的序列得到全部的 *PtrZHDs*^[12]。从 Phytozome 数据库中获取 *PtrZHD* 家族基因的染色体位置、基因序列以及开放阅读框长度等信息,并根据基因所在染色体号及位置对其进行命名。在 ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 网

站预测 *PtrZHD* 家族分子质量、等电点和氨基酸序列长度。

1.3 *PtrZHD* 家族系统发育分析

将鉴定出的毛果杨 ZHD 氨基酸序列与已知的拟南芥^[10]、水稻^[11] 和大白菜^[2] 的 ZHD 氨基酸序列在 MEGA X 软件的 ClustaW 程序中进行多重序列比对, 采用邻近法 (NJ) 构建系统进化树, 步长设为 10 000 次, 得到系统发育进化树数据^[18], 经 EvolView(<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 网站可视化。

1.4 *PtrZHD* 家族同源基因的同义替换率 (K_s) 和非同义替换率 (K_a) 分析

将 *PtrZHD* 家族基因的蛋白质编码序列 (CDs) 在美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 BLAST 比对, 以超过 300 bp 且同源性超过 80% 为标准鉴定同源基因对^[19], 同源关系经 TBtools^[20] 软件可视化。利用 TBtools 计算同源基因的 K_s 、 K_a 以及 K_a/K_s ^[20-21]。

1.5 *PtrZHD* 家族结构及保守型基序分析

从毛果杨数据库 (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=Ptrichocarpa>) 获得 *PtrZHD* 外显子和内含子长度及位置信息, 并通过 TBtools 软件可视化。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 网站对 *PtrZHD* 家族进行保守基序分析, 保守域数目设置为 15, 结果由 TBtools 软件可视化。

1.6 *PtrZHD* 家族启动子区顺式作用元件分析

利用 TBtools 软件从毛果杨基因组数据中提取 *PtrZHD* 家族起始密码子前 2 000 bp 的序列作为启动子区域, 上传至 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 网站进行顺式作用元件分析^[22], 获得的数据通过 TBtools 软件可视化。

1.7 *PtrZHD* 家族表达特性分析

1.7.1 组织表达特异性 将野生型毛果杨通过组织培养扩繁后, 挑选长势一致的 4 周龄组培苗, 分别采集根、茎和叶组织, 提取 RNA 后反转录成 cDNA, 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。每组处理重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量, 并通过 TBtools 软件可视化。

1.7.2 干旱胁迫下的响应特性 将长势一致的 1 月龄组培苗随机分成 6 组。用质量分数为 8% 的 PEG 6000 处理 0、6、12、24、48 和 72 h。分别采集各处理组植株的根、茎和叶组织, 提取 RNA 后反转录成 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。每组处理重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量, 并通过 TBtools 软件可视化。

1.7.3 RNA 提取、反转录及 qRT-PCR 分析 利用植物总 RNA 试剂盒 (TSP412, 北京擎科生物科技有限公司) 提取总 RNA, 然后采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit [Perfect Real Time, 宝生物工程 (大连) 有限公司] 试剂盒反转录 RNA, 获得 cDNA 后进行 qRT-PCR 分析。将 *PtrZHD* 家族蛋白质编码区序列上传至上海生工定量引物设计网站 (<https://www.sangon.com/new/PrimerDesign>) 设计定量引物, 以 *PtrActin* 为内参基因^[19]。在赛默飞 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行试验, 体系如下: 2×TransStart TOP/Tip Green qPCR Super mix 10 μL、定量引物上下游混合引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL、cDNA 1.5 μL、Passive Reference Dye II (50×) 0.4 μL, 加去离子水补充至 20 μL 体系。反应程序: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 35 s, 40 次循环。

2 结果与分析

2.1 *PtrZHD* 家族成员的鉴定及编码蛋白的基本特征

将所有含 ZF-HD_dimer (PF04770) 结构域的序列上传到 Pfam 和 SMART 数据库, 去除冗余序列后从毛果杨基因组中鉴定出 21 个 *PtrZHD* (表 1), 根据基因所在染色体及染色体上的位置信息, 将它们分别命名为 *PtrZHD1*~*PtrZHD21*。*PtrZHD* 家族基因编码蛋白的基本特征分析表明: 各 *PtrZHD* 所编码蛋白的长度为 73~339 个、分子量为 8.28~37.98 kDa、等电点为 6.39~9.31、编码序列长度为 222~1 020 bp, 蛋白长度、分子量、等电点和编码序列长度差异明显。表明 *PtrZHD* 家族基因及其编码蛋白特征存在较大差异, 即该家族各个成员的生物学功能发生了分化。

2.2 *PtrZHD* 家族的进化

利用双子叶植物 (拟南芥、毛果杨和大白菜) 与单子叶植物 (水稻) 的 ZHD 蛋白序列构建系统进化树 (图 1), *PtrZHD* 家族分为 2 个种类 (ZHD 和 MIF), 这 2 个种类可以分成 7 个亚族 (I~VII)^[5, 8, 12], *PtrZHD* 不同亚族中即包括单子叶植物又包括双子叶植物, 表明该基因家族的分化早于单双子叶植物的分化。

表 1 毛果杨 ZHD 家族基因概况

登录号	基因名	基因位置	蛋白长度/个	分子量/kDa	等电点	编码序列长度/bp
Potri.002G035200.1	<i>PtrZHD1</i>	Chr02: 2259632..2261632	293	32.84	8.22	882
Potri.002G102900.1	<i>PtrZHD2</i>	Chr02: 7442579..7444098	262	27.92	7.28	789
Potri.003G000400.1	<i>PtrZHD3</i>	Chr03: 70322..71164	253	28.01	7.71	762
Potri.003G146700.1	<i>PtrZHD4</i>	Chr03: 16229434..16229655	73	8.28	7.73	222
Potri.004G11.300.1	<i>PtrZHD5</i>	Chr04: 12287585..12289662	334	36.77	8.70	1005
Potri.004G126600.1	<i>PtrZHD6</i>	Chr04: 12337842..12338677	130	14.17	6.81	393
Potri.004G135100.1	<i>PtrZHD7</i>	Chr04: 15528323..15529129	268	29.44	8.83	807
Potri.004G229600.1	<i>PtrZHD8</i>	Chr04: 23480758..23482600	271	30.06	8.39	816
Potri.005G11.300.1	<i>PtrZHD9</i>	Chr05: 9522291..9525287	339	37.98	9.19	1020
Potri.005G158800.1	<i>PtrZHD10</i>	Chr05: 16017482..16019310	257	27.73	6.43	774
Potri.005G227900.1	<i>PtrZHD11</i>	Chr05: 23746838..23749246	290	32.32	8.88	873
Potri.007G024100.1	<i>PtrZHD12</i>	Chr07: 1814109..1816426	331	36.75	9.31	996
Potri.008G086000.1	<i>PtrZHD13</i>	Chr08: 5402319..5403293	324	35.57	8.83	975
Potri.010G169400.1	<i>PtrZHD14</i>	Chr10: 17139193..17140688	332	36.41	9.21	999
Potri.012G040900.1	<i>PtrZHD15</i>	Chr12: 3680805..3681724	182	20.66	6.39	549
Potri.013G108900.1	<i>PtrZHD16</i>	Chr13: 12226035..12227366	281	31.74	7.71	846
Potri.015G032700.1	<i>PtrZHD17</i>	Chr15: 2637644..2638216	190	21.44	6.17	573
Potri.017G082700.1	<i>PtrZHD18</i>	Chr17: 9830334..9831749	161	17.36	5.93	486
Potri.017G082900.1	<i>PtrZHD19</i>	Chr17: 9903467..9905775	337	37.23	8.23	1014
Potri.019G021400.1	<i>PtrZHD20</i>	Chr19: 2418959..2419646	132	14.83	8.83	399
Potri.019G081300.1	<i>PtrZHD21</i>	Chr19: 11464924..11465688	184	20.87	9.91	555

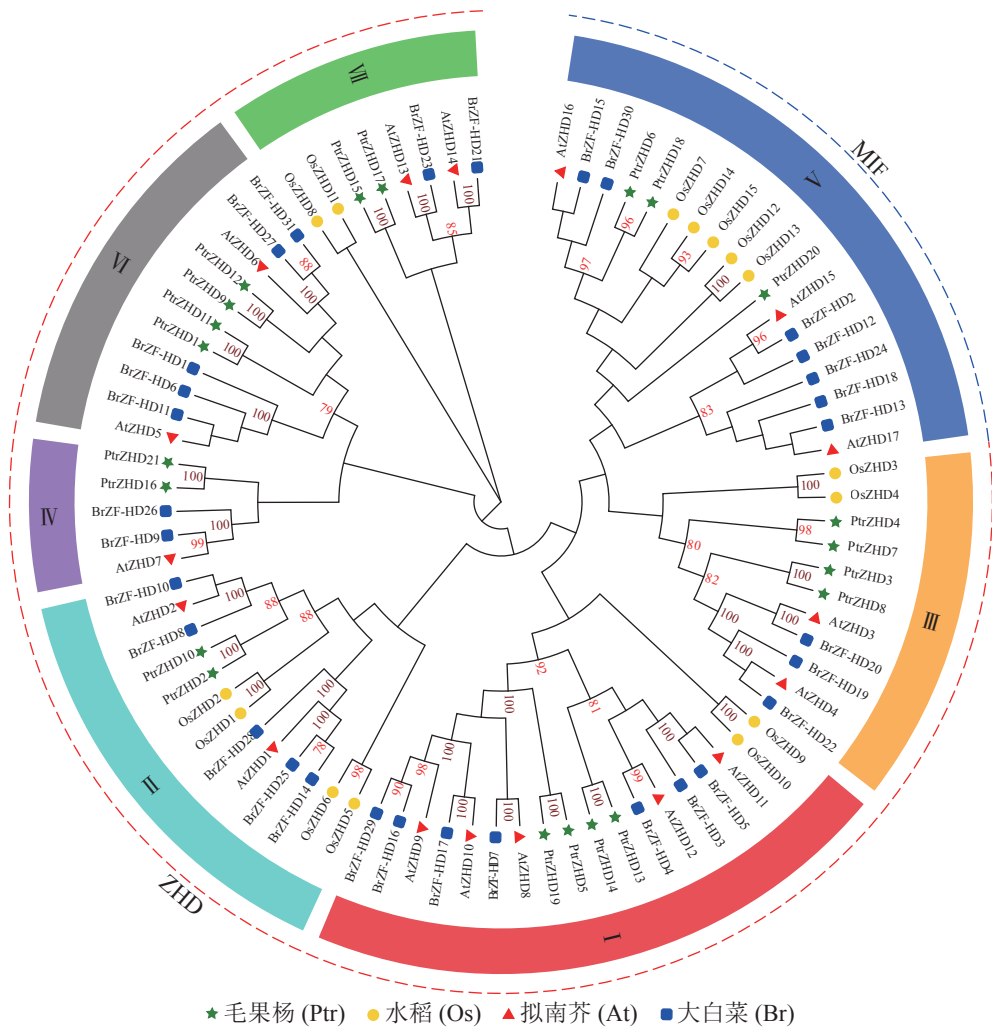


图 1 毛果杨、拟南芥、水稻和大白菜 ZHD 家族系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of ZHD protein family in *P. trichocarpa*, *A. thaliana*, *O. sativa* and *B. rapa* ssp. *pekinensis*

2.3 *PtrZHD* 家族的扩张

PtrZHD 家族成员在毛果杨染色体上的分布 (图 2) 显示：21 个 *PtrZHD* 不均匀地分布在毛果杨 12 条染色体上；4、5 号染色体上分别分布 4 和 3 个 *ZHD*，2、3、17 和 19 号染色体上各分布 2 个 *ZHD*，7、8、10、12、13 和 15 号染色体上只分布 1 个 *ZHD*，1、6、9、11、14、16 和 18 号染色体上无 *ZHD* 分布。*PtrZHD* 家族编码序列 Blast 结果表明：*PtrZHD1* 和 *PtrZHD11*、*PtrZHD2* 和 *PtrZHD10*、*PtrZHD3* 和 *PtrZHD8*、*PtrZHD5* 和 *PtrZHD19*、*PtrZHD6* 和 *PtrZHD18*、*PtrZHD9* 和 *PtrZHD12*、*PtrZHD13* 和 *PtrZHD14* 以及 *PtrZHD15* 和 *PtrZHD17* 有共线性关系 (图 2 和表 2)，同源片段长度大于 300 bp 且同源性超过 80%，是进化过程中由于全基因组复制和串联复制而形成的同源基因^[3, 22]，表明 *PtrZHD* 可能通过全基因组复制和串联复制进行家族扩张。8 对同源基因的 K_a/K_s 均小于 1 (表 2)，说明 *PtrZHD* 家族在进化过程中经历了纯化选择，留存的基因较为保守^[3]。

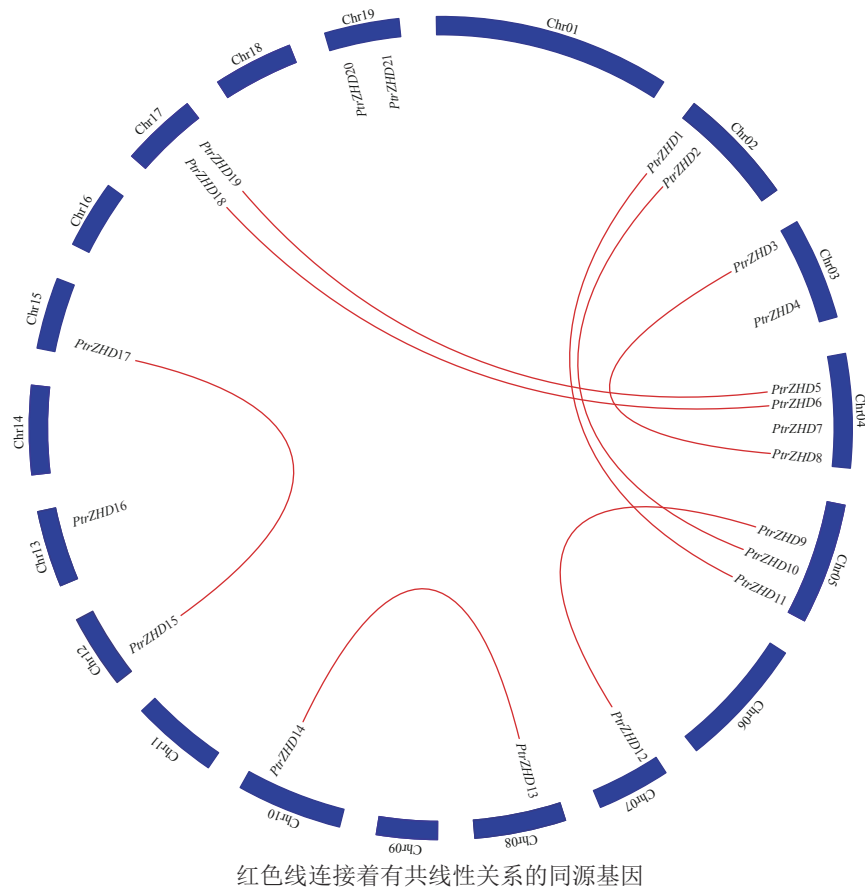


图 2 *PtrZHD* 家族基因染色体定位及同源性分析

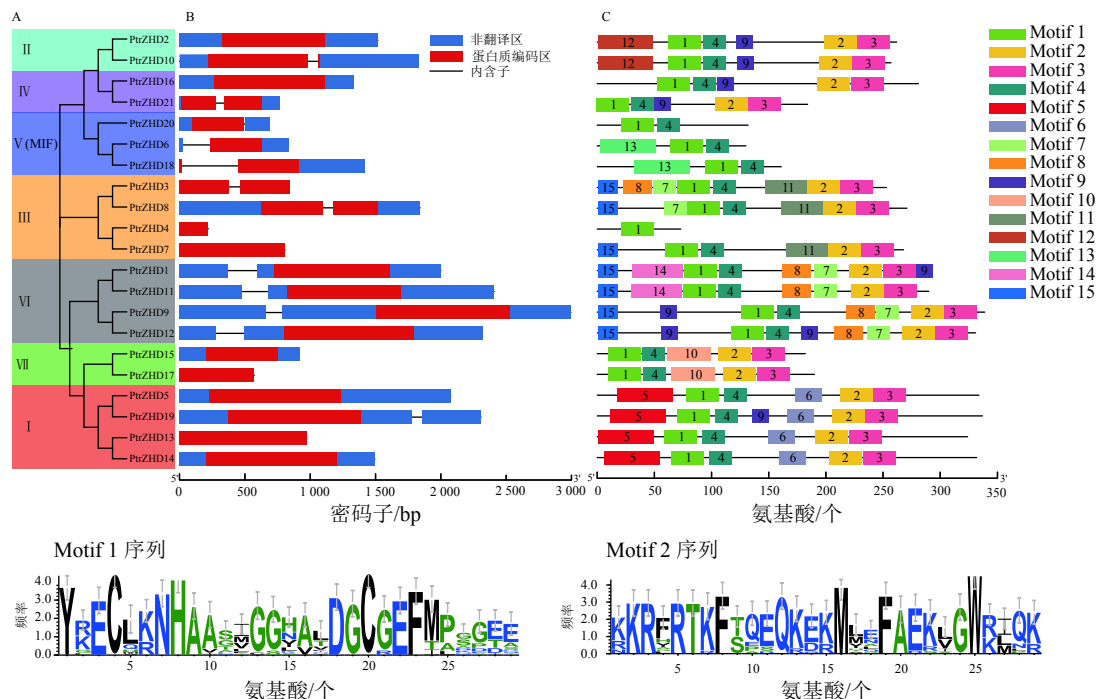
Figure 2 Chromosome localization and homology analysis of *PtrZHD* gene

表 2 同源基因的 K_a/K_s 及同源性

同源基因		Table 2 K_a/K_s values and homologous status of homologous genes				
基因1	基因2	非同义替换率(K_a)	同义替换率(K_s)	K_a/K_s	同源片段长度/bp	同源性
<i>PtrZHD1</i>	<i>PtrZHD11</i>	0.06	0.32	0.19	787	0.90
<i>PtrZHD2</i>	<i>PtrZHD10</i>	0.04	0.19	0.21	711	0.92
<i>PtrZHD3</i>	<i>PtrZHD8</i>	0.08	0.36	0.22	682	0.86
<i>PtrZHD5</i>	<i>PtrZHD19</i>	0.08	0.35	0.23	779	0.88
<i>PtrZHD6</i>	<i>PtrZHD18</i>	0.07	0.18	0.39	357	0.91
<i>PtrZHD9</i>	<i>PtrZHD12</i>	0.08	0.29	0.28	875	0.85
<i>PtrZHD13</i>	<i>PtrZHD14</i>	0.09	0.36	0.25	838	0.85
<i>PtrZHD15</i>	<i>PtrZHD17</i>	0.05	0.27	0.19	496	0.90

2.4 *PtrZHD* 家族基因结构及其编码蛋白保守基序

PtrZHD 家族 21 个成员中有 11 个成员含有内含子 (图 3B), 这之前报道的其他物种 *ZHD* 家族中有内含子的成员数量较少的研究结果稍有不同^[5, 12]。PtrZHD 蛋白具有 2 个保守性较高的基序: 同源结构域序列 (Motif 1) 和锌指结构域序列 (Motif 2)(图 3C)。Motif 2 与 DNA 的特异性结合有关; Motif 1 与蛋白二聚体的形成有关^[7]。所有的 *PtrZHD* 蛋白都具有 Motif 1, 而且除了 *PtrZHD4* 和亚族 V (MIF) 的成员之外, 其他家族成员都含 Motif 2, 说明该家族成员在进化过程中比较保守。



A. 系统进化树; B. 基因结构; C. 保守基序。Motif 3~15 为其他保守氨基酸序列; Motif 1~15 用内含对应数字的不同色块表示

图 3 *PtrZHD* 家族基因结构和蛋白保守基序分析

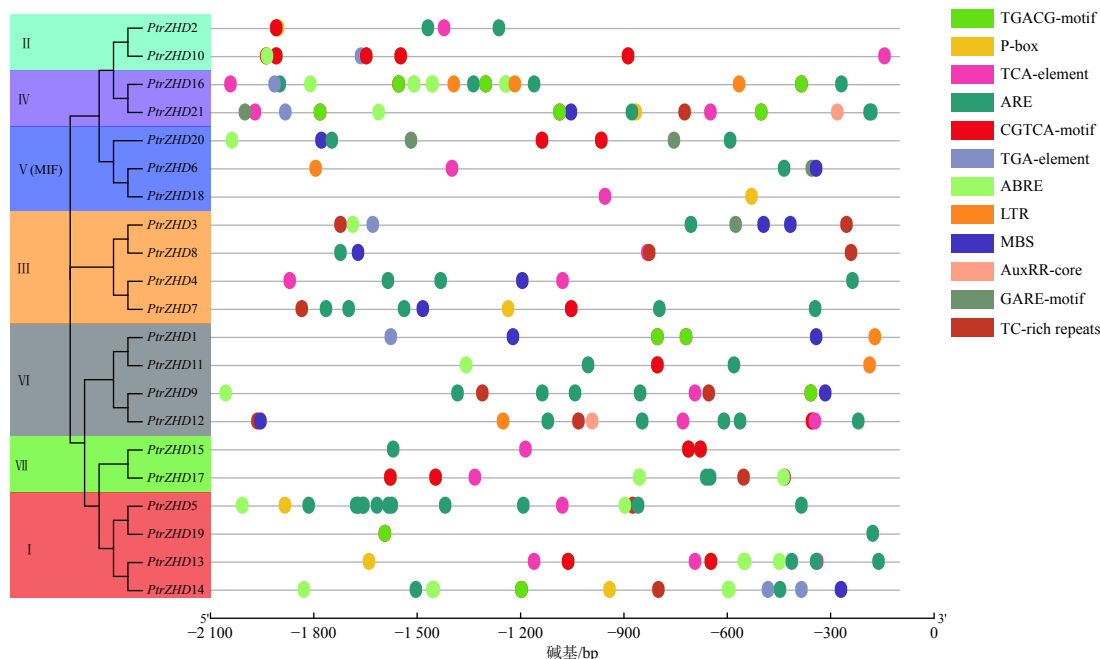
Figure 3 Analysis of gene structure and protein conserved motif of *PtrZHD* gene

2.5 *PtrZHD* 家族启动子区顺式作用元件

PtrZHD 家族启动子区顺式作用元件可分为 2 个大类 (图 4): 第一大类为植物激素响应元件, 共有 5 种, 分别为生长素响应元件 (AuxRR-core、TGA-element), 水杨酸响应元件 (TCA-element), 茉莉酸甲酯响应元件 (CGTC-motif、TGACG-motif), 脱落酸响应元件 (ABRE) 和赤霉素响应元件 (P-box、GARE-motif); 第二大类为非生物胁迫响应元件, 共有 4 种, 分别为厌氧诱导元件 (ARE)、干旱诱导性结合位点 (MBS)、抗病和胁迫诱导元件 (TC-rich repeats) 和低温响应元件 (LTR)。PtrZHD 家族各基因启动子区存在不同类型的作用元件, 但处于同一亚族的各基因含有相似的作用元件 (图 4), 亚族 I 主要包含茉莉酸甲酯响应元件、脱落酸响应元件、赤霉素响应元件和厌氧诱导元件; 亚族 II 主要包含水杨酸响应元件和茉莉酸甲酯响应元件; 亚族 III 主要包含厌氧诱导元件、MYB 干旱诱导性结合位点以及抗病和胁迫诱导元件; 亚族 IV 主要包含生长素响应元件, 水杨酸响应元件, 茉莉酸甲酯响应元件, 脱落酸响应元件和厌氧诱导元件; 亚族 V 主要包含水杨酸响应元件、赤霉素响应元件、厌氧诱导元件和 MYB 干旱诱导性结合位点; 亚族 VI 主要包含茉莉酸甲酯响应元件、厌氧诱导元件、MYB 干旱诱导性结合位点和低温响应元件; 亚族 VII 主要包含水杨酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和厌氧诱导元件。以上结果说明: *PtrZHD* 家族可能对植物激素和逆境胁迫有响应能力, 虽然不同基因之间响应元件种类存在差异, 但是同一亚族基因启动子区顺式作用元件种类基本相同。

2.6 *PtrZHD* 家族组织表达与干旱胁迫响应特征

为了了解 *ZHD* 在毛果杨生长发育和环境响应中的潜在功能, 利用 qRT-PCR 对毛果杨 *ZHD* 家族成员在根、茎和叶组织中的表达模式进行分析。结果 (图 5) 表明: 毛果杨 21 个 *PtrZHDs* 中有 1、7 和 13 个分别在根、茎和叶部组织偏好表达。亚族 I 和 III 的成员主要在叶中高表达; 亚族 II 和 IV 的成员全都在



AuxRR-core、TGA-element 为生长素响应元件, TCA-element 为水杨酸响应元件, CGTCA-motif、TGACG-motif 为茉莉酸甲酯响应元件, ABRE 为脱落酸响应元件, P-box、GARE-motif 为赤霉素响应元件, ARE 为厌氧诱导元件, MBS 为 MYB 干旱诱导性结合位点, TC-rich repeats 为抗病和胁迫诱导元件, LTR 为低温响应元件。横坐标刻度中 0 为启动子位置

图 4 *PtrZHD* 家族基因启动子区顺式作用元件分析

Figure 4 Analysis of cis-acting elements in promoter region of *PtrZHD* gene

叶中高表达;亚族V成员主要在茎中高表达;亚族VI成员主要在茎和叶中高表达;亚族VII成员在茎中高表达。毛果杨 *ZHD* 家族成员在根、茎和叶中有不同的表达特性,但同一亚族各成员偏好表达部位基本相同,说明 *ZHD* 在毛果杨根、茎和叶部组织中的生物学功能产生了分化,但同一亚族各成员功能相似。

从图 6 可知:在根中,随着干旱胁迫时间的增加,部分 *PtrZHD* 的表达量显著上调,达到峰值后逐渐降低, *PtrZHD3*、*PtrZHD8*、*PtrZHD9*、*PtrZHD10*、*PtrZHD11*、*PtrZHD5*、*PtrZHD13* 和 *PtrZHD14* 在干旱胁迫下表达量呈持续上升趋势, *PtrZHD1*、*PtrZHD6* 在干旱胁迫下表达量下降;在茎中,大部分 *PtrZHD* 在干旱胁迫后显著上调表达,达到峰值后逐渐降低,而 *PtrZHD2*、*PtrZHD3*、*PtrZHD5*、*PtrZHD6* 和 *PtrZHD7* 在干旱胁迫下表达量呈持续上升趋势;在叶中,大部分 *PtrZHD* 在干旱胁迫后表达量同样呈先升后降的趋势, *PtrZHD5*、*PtrZHD7* 和 *PtrZHD20* 在干旱胁迫下表达量持续下降,而 *PtrZHD1* 和 *PtrZHD18* 在干旱胁迫下表达量呈持续上升趋势。从响应速度来看,根中大部分 *PtrZHD* 基因响应干旱胁迫的快速上升期发生在 6、12 或 72 h,而在茎和叶中的快速上升期发生在 6 或 12 h。表明毛果杨 *ZHD* 家族各成员响应干旱胁迫且在胁迫中发挥不同的作用。

3 讨论

ZHD 是植物特有的转录因子,在植物生长发育和逆境胁迫响应中起着重要作用^[6,15]。本研究从全基因组水平鉴定出 21 个 *PtrZHDs* 家族成员,进化分析表明(图 1):21 个 *PtrZHDs* 可以分为 2 个不同的种类

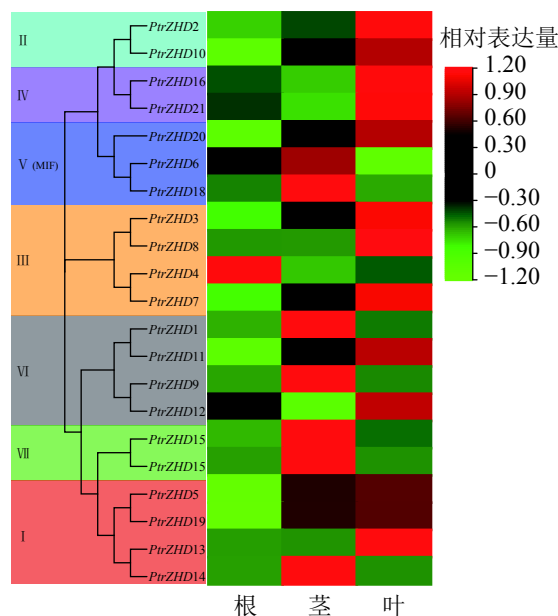
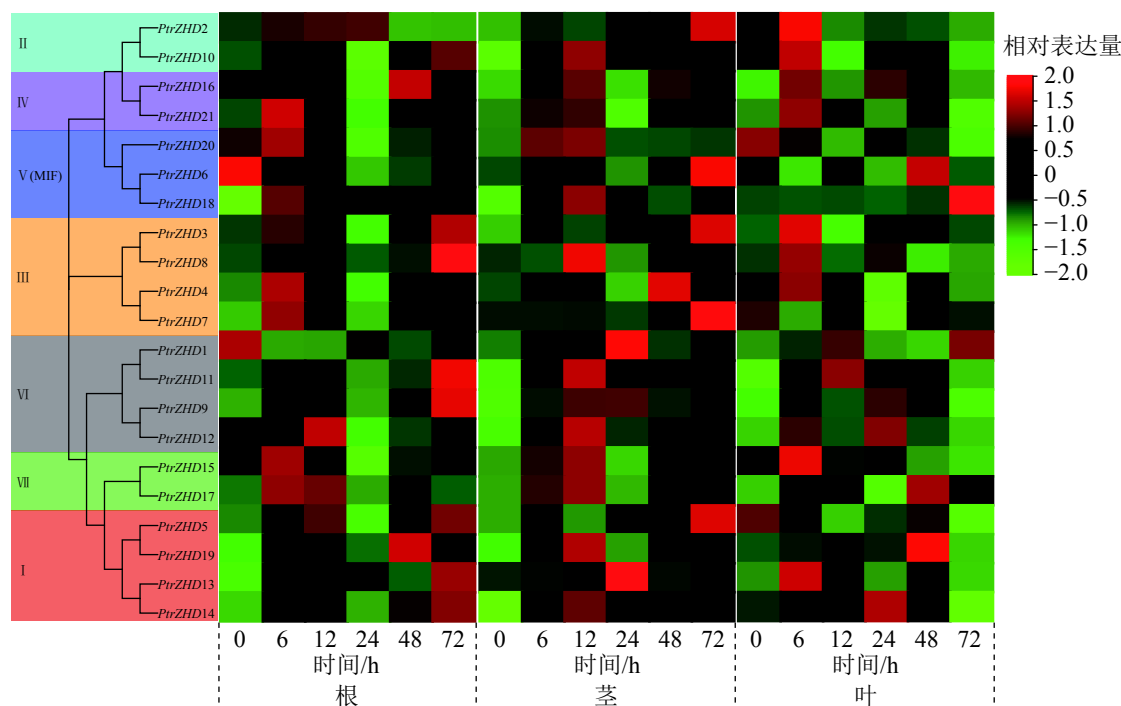


图 5 *PtrZHDs* 组织表达特异性分析

Figure 5 Analysis of tissue expression specificity of *PtrZHDs* gene

图6 不同组织中 *PtrZHDs* 在干旱胁迫下的表达谱分析Figure 6 Expression profile analysis of *PtrZHDs* gene in different tissues under drought stress

(ZHD 和 MIF)、7 个亚族 (I~VII)，这与葡萄^[8]、茶树^[5] 和黄瓜^[12] 中的分类基本一致。

PtrZHD 家族有 76% 的成员涉及全基因组复制和串联复制现象, 说明该基因家族扩张的主要方式是全基因组复制和串联复制^[22-23], 基因复制可以提供丰富的遗传物质有助于毛果杨适应外界环境。*PtrZHD* 家族同源基因的 K_a/K_s 均小于 1, 表明纯化作用在该基因家族进化过程中存在一定的选择压力^[3], 说明 *PtrZHD* 家族基因具有较强的保守性。同时, *PtrZHD* 家族基因编码蛋白保守基序分析发现: 21 个 *PtrZHD* 蛋白具有 2 个保守性较高的基序 Motif 1 和 Motif 2, 进一步说明 *PtrZHD* 家族在进化过程中较为保守。

启动子分析发现: 虽然 *PtrZHD* 家族启动子区顺式作用元件的种类不同, 但处于同一亚族基因启动子区顺式作用元件类型基本相同, 同时, 同一亚族基因编码蛋白的保守基序也基本相同, 表明 *PtrZHD* 家族不同亚族的生物学功能产生了分化, 但同一亚族各基因的生物学功能基本相同; *PtrZHD* 家族成员在毛果杨根、茎和叶部组织中具有偏好性表达特征, 但同一亚族基因的偏好表达部位基本相同。

毛果杨中具有内含子的 *ZHD* 占比 (52%) 多于拟南芥 (0%)^[2]、水稻 (33%)^[24]、玉米 *Zea mays* (13%)^[24]、黄瓜 (38%)^[14]、苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (20%)^[25]、大白菜 (3%)^[2] 和番茄 (4%)^[3] 等草本植物, 内含子增多可以加大转录本的多样性, 提高生物的抗逆能力^[26]。因此, 毛果杨 *ZHD* 的内含子比草本植物多的原因可能是毛果杨生命周期长、生存空间大, 需要应对更为复杂的环境挑战, 所以进化出了更多含有内含子的基因以保证其正常生长发育。

ZHD 能够调控植物的生长发育和对干旱胁迫的抗性, 如过表达 *AtZHD1* 可以提高拟南芥的耐旱性^[13], *OsZHD1* 基因过表达导致水稻叶片卷曲下垂, 降低水稻的耐旱性^[14]; 毛果杨亚族 II 中的 *PtrZHD2*、*PtrZHD10* 与 *AtZHD1*、*OsZHD1* 聚类在一起, 且同时在叶部组织中高表达, 表明 *PtrZHD2* 和 *PtrZHD10* 可能通过调控毛果杨叶片的生长发育来响应干旱胁迫的。生物在遭受胁迫时, 基因的相关顺势作用元件会影响其自身的转录以响应胁迫^[27], *PtrZHD* 家族基因启动子区含有 MYB 干旱诱导性结合位点, 而且 *PtrZHD* 家族基因在干旱胁迫下的表达量会随着胁迫时间的增加而发生变化, 进一步说明在毛果杨干旱胁迫的响应中, *PtrZHD* 家族基因发挥着重要的调控作用。

4 结论

本研究在全基因组水平上鉴定出 21 个 *PtrZHDs*, 通过系统发育将其分为 7 个亚族; 同源性及 K_a 、

K_s 分析表明: *PtrZHD* 通过全基因组复制和串联复制进行家族扩张且在进化过程中经历了纯化选择; 启动子顺式作用元件分析表明: *PtrZHD* 家族基因能够响应干旱胁迫信号; 基因结构和基序分析表明: *PtrZHD* 家族基因功能发生了分化但同一亚族基因生物学功能基本相同; 组织表达特异性和干旱胁迫下的表达模式表明: 毛果杨 ZHD 在不同组织中行使特定的生物学功能且能够响应干旱胁迫。

5 参考文献

- [1] 莫晓婷, 赵军, 范云六, 等. 玉米转录因子结构与功能研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, **15**(3): 7–17.
MO Xiaoting, ZHAO Jun, FAN Yunliu, *et al.* Research progress on structure and function of maize transcription factors [J]. *J Agric Sci Technol*, 2013, **15**(3): 7–17.
- [2] WANG Wenli, WU Peng, LI Ying, *et al.* Genome-wide analysis and expression patterns of ZF-HD transcription factors under different developmental tissues and abiotic stresses in Chinese cabbage [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, **291**(3): 1451–1464.
- [3] KHATUN K, NATH U K, ROBIN A H K, *et al.* Genome-wide analysis and expression profiling of zinc finger homeodomain (ZHD) family genes reveal likely roles in organ development and stress responses in tomato [J/OL]. *BMC genomics*, 2017, **18**(1): 695[2021-03-13]. doi: [10.1186/s12864-017-4082-y](https://doi.org/10.1186/s12864-017-4082-y).
- [4] 马瑞芳, 陈家璐, 刘笑雨, 等. 毛竹锌指同源结构域基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2020, **28**(4): 645–657.
MA Ruifang, CHEN Jialu, LIU Xiaoyu, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of zinc finger homologous domain gene family in *Phyllostachys edulis* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2020, **28**(4): 645–657.
- [5] ZHOU Chengzhe, ZHU Chen, XIE Siyi, *et al.* Genome-wide analysis of zinc finger motif-associated homeodomain (ZF-HD) family genes and their expression profiles under abiotic stresses and phytohormones stimuli in tea plants (*Camellia sinensis*) [J/OL]. *Sci Hortic*, 2021, **281**(5): 109976[2021-02-25]. doi: [10.1016/J.SCIENTA.2021.109976](https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.109976).
- [6] SUN Jinhao, XIE Minmin, LI Xiaoxu, *et al.* Systematic investigations of the ZF-HD gene family in tobacco reveal their multiple roles in abiotic stresses [J/OL]. *Agronomy*, 2021, **11**(3): 406[2021-04-05]. doi: [10.3390/agronomy11030406](https://doi.org/10.3390/agronomy11030406).
- [7] HU Wei, DEPAMPHILIS C W, MA Hong. Phylogenetic analysis of the plant-specific zinc finger-homeobox and mini zinc finger gene families [J]. *J Integrative Plant Biol*, 2008, **50**(8): 1031–1045.
- [8] WANG Hao, YIN Xiangjing, LI Xiaoqin, *et al.* Genome-wide identification, evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) zinc finger-homeodomain gene family [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, **15**(4): 5730–5748.
- [9] WINDHÖVEL A, HEIN I, DABROWA R, *et al.* Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, **45**(2): 201–214.
- [10] TAN Q K, IRISH V F. The arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development [J]. *Plant Physiol*, 2006, **140**(3): 1095–1108.
- [11] JAIN M, TYAGI A K, KHURANA J P. Genome-wide identification, classification, evolutionary expansion and expression analyses of homeobox genes in rice [J]. *FEBS J*, 2008, **275**(11): 2845–2861.
- [12] LAI Wei, ZHU Chuxia, HU Zhaoyang, *et al.* Identification and transcriptional analysis of zinc finger-homeodomain (ZF-HD) family genes in cucumber [J]. *Biochem Genet*, 2021, **59**(4): 884–901.
- [13] TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, *et al.* Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in Arabidopsis [J]. *Plant J*, 2007, **49**(1): 46–63.
- [14] XU Yang, WANG Yihua, LONG Qizhang, *et al.* Overexpression of *OsZHD1*, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice [J]. *Planta*, 2014, **239**(4): 803–816.
- [15] PARK H C, KIM M L, LEE S M, *et al.* Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (GmCaM4) promoter [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(11): 3612–3623.
- [16] ABU-ROMMAN S. Molecular cloning and expression analysis of zinc finger-homeodomain transcription factor *TaZFHD1* in wheat [J]. *S Afr J Bot*, 2014, **91**: 32–36.
- [17] FIGUEIREDO D D, BARROS P M, CORDEIRO A M, *et al.* Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene *OsDREB1B* [J]. *J Exp Bot*, 2012, **63**(10): 3643–3656.

- [18] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, **35**(6): 1547 – 1549.
- [19] 刘聪, 张洋, 夏德安, 等. 毛果杨 *PLD* 基因家族全基因组水平鉴定及其盐胁迫下的表达分析[J]. 林业科学研究, 2021, **34**(3): 23 – 36.
LIU Cong, ZHANG Yang, XIA De'an, *et al.* Genome-wide identification of *PLD* gene family of *Populus trichocarpa* and its responses to salt stress [J]. *For Res*, 2021, **34**(3): 23 – 36.
- [20] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [21] HURST L D. The K_a/K_s ratio: diagnosing the form of sequence evolution [J]. *Trends Genet*, 2002, **18**(9): 486 – 487.
- [22] 阮诗雨, 张智俊, 陈家璐, 等. 毛竹 *GRF* 基因家族全基因组鉴定与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2021, **38**(4): 792 – 801.
RUAN Shiyu, ZHANG Zhijun, CHEN Jialu, *et al.* Genome identification and expression analysis of *GRF* gene family in *Phyllostachys edulis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2021, **38**(4): 792 – 801.
- [23] 张金鹏, 酆芝汀, 吴海楠, 等. 几种杨树全基因组复制事件与进化分析[J/OL]. 分子植物育种, 2020[2021-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201216.1635.010.html>.
ZHANG Jinpeng, LI Zhiting, WU Hainan, *et al.* Whole genome duplication events and evolutionary analyses of several populus species [J/OL]. *Mol Plant Breed*, 2020[2021-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201216.1635.010.html>.
- [24] 李春艳. 玉米 ZF-HD 转录因子家族耐盐、抗旱相关基因的鉴定及特性分析[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
LI Chunyan. *Identification and Characterization of Drought and Salt Resistance-related Genes of ZF-HD Transcription Factors Family in Maize* [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [25] LIU Moyang, WANG Xiaoxiang, SUN Wenjun, *et al.* Genome-wide investigation of the ZF-HD gene family in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2019, **19**(1): 248[2021-04-24]. doi: [10.1186/s12870-019-1834-7](https://doi.org/10.1186/s12870-019-1834-7).
- [26] MORGAN J T, FINK G R, BARTEL D P. Excised linear introns regulate growth in yeast [J]. *Nature*, 2019, **565**(7741): 606 – 611.
- [27] 方佳, 何勇清, 余敏芬, 等. 植物生长素响应因子基因的研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(4): 611 – 616.
FANG Jia, HE Yongqing, YU Minfen, *et al.* Recent advances with auxin response factors (ARFs): a review [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2012, **29**(4): 611 – 616.